



UNIwersytet
MEDYCZNY
w ŁODZI

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Katedra i Klinika Hematologii

93–510 Łódź, ul. Ciołkowskiego 2

Tel./fax: (+42) 6895191/6895192

Łódź, 16.08.2018 r.

**Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych mgr Marty
Kłopotowskiej pt. „Zbadanie wpływu wybranych mechanizmów
antyoksydacyjnych na aktywność komórek NK”**

Komórki NK są populacją dużych ziarnistych limfocytów mającą zdolność rozpoznawania i niszczenia komórek zakażonych wirusami i komórek nowotworowych. We krwi obwodowej u ludzi komórki te stanowią od 5 do 15% populacji limfocytów krwi. Niektóre subpopulacje tych komórek mają właściwości odpowiedzi swoistej, o zdolnościach pamięci immunologicznej. Komórki te mają też właściwości cytotoksyczne, przeciwinfekcyjne i przeciwnowotworowe. Mechanizmy cytotoksycznego działania komórek NK są obecnie dość dobrze poznane. Mogą one zabijać komórki docelowe w mechanizmie naturalnej cytotoksyczności oraz w mechanizmie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał. W warunkach fizjologicznych komórki NK nie wywierają efektu cytotoksycznego przeciw komórkom prawidłowym organizmu lecz niszczą komórki zakażone wirusami i komórki nowotworowe. Mimo że ich przeciwnowotworowe działanie jest dość dobrze udokumentowane to możliwość klinicznego wykorzystania tych komórek nadal pozostaje w sferze badań. Szczególne zainteresowanie budzi możliwość ich wykorzystania w terapii CAR (*chimeric antygen receptor*), która jest już stosowana w klinice z udziałem limfocytów T (CART) do leczenia niektórych nowotworów.

Jedną z potencjalnych przeszkód w terapeutycznym wykorzystaniu komórek NK jest ich zwiększona wrażliwość na stres oksydacyjny. Dlatego należy uznać za uzasadnione podjęcie przez mgr Martę Kłopotowską badań nad rolą niektórych

czynników antyoksydacyjnych, które mogą chronić komórki NK przed działaniem stresu oksydacyjnego. Magister Kłopotowska postanowiła zbadać wpływ stresu oksydacyjnego na przeżycie oraz funkcje efektorowe komórek NK, a także mechanizmy regulacji peroksyredokiny (PRDX1) w komórkach NK. W tym celu oceniała wpływ zahamowania PRDX1 na przeżycie komórek NK oraz ich funkcje efektorowe oraz wpływ zwiększonej ilości PRDX1 w komórkach NK na ich przeżycie w warunkach stresu oksydacyjnego. Zajmowała się również optymalizacją modyfikacji komórek NK w systemie CAR i badała wpływ zwiększenia ilości PRDX1 w komórkach CD19-CAR NK na ich przeżycie w warunkach stresu oksydacyjnego.

Materiał i metody zastosowane przez doktorantkę zostały dokładnie przedstawione w pracy. W jasny i profesjonalny sposób opisała metody prowadzenia hodowli komórkowych, metodę izolacji jednojądrzastych komórek krwi oraz komórek NK, limfocytów T i limfocytów B, a także sposób inkubacji komórek z testowanymi związkami i ocenę ich wrażliwości na nadtlenuk wodoru. Pozostałe techniki badawcze, jak metody oceny komórek w cytometrii przepływowej, western blotting, ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qRT-PCR), modyfikacja pierwotnych komórek NK metodą elektroporacji mRNA zsyntetyzowanym w warunkach *in vitro* są również bardzo dobrze przedstawione. Modyfikacja linii komórkowej NK-92 i transdukcja lentiwirusowa komórek NK-92 opisane są na tyle dokładnie, że umożliwiają powtórzenie doświadczeń przez innych badaczy. Należy podkreślić adekwatny dobór technik badawczych oraz ich syntetyczny, przejrzysty opis, stanowiący świadectwo ich zrozumienia i doświadczenia Autorki w ich stosowaniu.

Przeprowadzone badania umożliwiły uzyskanie oryginalnych i ważnych z naukowego punktu widzenia wyników. Za najistotniejsze obserwacje uważam wykazanie, że komórki NK są bardziej wrażliwe na działanie stresu oksydacyjnego niż limfocyty T oraz limfocyty B. Magister Marta Kłopotowska stwierdziła również, że w warunkach stresu oksydacyjnego występuje upośledzenie przeżycia komórek NK oraz zahamowanie ich funkcji efektorowych. Dowiodła ponadto że w komórkach tych poziom PRDX1 jest niższy niż w limfocytach T oraz limfocytach B a jego ilość w komórkach NK zwiększa się w wyniku aktywacji IL-2, PHA przy jednoczesnej hodowli z wykorzystaniem komórek typu „feeder cells” oraz po stymulacji cytokinami IL-2 lub IL-15. Pod wpływem IL-15 w komórkach NK dochodzi również do zwiększenia ilości PRDX1, a także TXN1 i TXNRD1. Ważną obserwacją jest fakt, że

zahamowanie szlaku przekazywania sygnałów z mTOR przez zastosowanie inhibitorów mTOR oraz inhibitorów PI3K prowadzi do obniżenia ilości mRNA dla PRDX1 w komórkach NK, a zahamowanie PRDX1 lub usunięcie genu dla PRDX1 uwrażliwia komórki NK na działanie stresu oksydacyjnego, indukowanego przez H₂O₂. Z drugiej strony, przeprowadzone badania wskazują, że zwiększenie poziomu PRDX1 w komórkach NK wydłuża czas ich przeżycia w obecności H₂O₂. Należy zwrócić uwagę, że opis wyników badań jest dokładny i zrozumiały. Dokumentacja graficzna wyników jest bardzo przejrzysta, pozwala na płynne śledzenie kolejnych danych. W części „Dyskusja” Autorka w sposób niezwykle precyzyjny omawia uzyskane przez siebie wyniki w kontekście innych dostępnych doniesień. Sposób prowadzenia dyskusji i trafność zastosowanych cytowań wymaga szczególnego podkreślenia. Świadczy on o doskonałej orientacji Autorki w temacie oraz o zdolności do jasnego, precyzyjnego formułowania myśli.

Praca jest bardzo dobrze napisana. Z nielicznych uwag krytycznych, wszystkie mają charakter nieprawidłowości redakcyjnych. Brakuje konsekwencji w przedstawianiu wyjaśnień skrótów w tekście. Większość jest zestawiona w formie listy na początku pracy. Część z nich jest potem wyjaśniana w tekście a innych nie ma w spisie skrótów albo nie są nigdzie wyjaśnione. Na stronie 45 figurują „antygeny klasy” – nie podano której.

Podsumowując, mgr Marta Kłopotowska w swojej pracy doktorskiej wykazała istotną rolę PRDX1 w funkcjonowaniu komórek NK w warunkach stresu oksydacyjnego i dowiodła, że zwiększenie ilości PRDX1 poprawia przeżycie komórek NK oraz komórek CAR-NK w obecności H₂O₂. Może to znaleźć zastosowanie praktyczne w terapiach adoptywnych z wykorzystaniem komórek NK. Oceniając rozprawę doktorską mgr Marty Kłopotowskiej pragnę stwierdzić, że nie mam żadnych zastrzeżeń merytorycznych odnośnie założeń i celu podjętych badań, zastosowanych metod badawczych i uzyskanych wyników. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka wykonała z dużym profesjonalizmem badania, wymagające głębokiej wiedzy i dużego doświadczenia w pracy laboratoryjnej. Ponadto samodzielnie rozwiązała problemy niezwykle istotne z punktu widzenia zarówno naukowego, jak i potencjalnie klinicznego.

W moim przekonaniu rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 poz. 882 z późn.zm.). W związku

z powyższym mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wysoce pozytywną recenzję przedstawionej mi rozprawy i prosić Wysoką Radę o dopuszczenie mgr Marty Kłopotowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jestem przekonany, że ze względu na wysokie walory naukowe i poznawcze praca mgr Marty Kłopotowskiej zasługuje na wyróżnienie, o co jednocześnie wnioskuję.

KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Hematologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Prof. dr hab. med. Tadeusz Robak